

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.18.005

培哚普利下调糖尿病大鼠肾小管间质清道夫受体 A 表达

曾映娟, 孙莹, 文江华, 胡芳, 罗顺葵, 鲁红云[△]
(中山大学附属第五医院内分泌科, 广东珠海 519000)

[摘要] **目的** 探讨培哚普利对链脲佐菌素(STZ)诱导的大鼠糖尿病模型肾小管间质中清道夫受体 A(SR-A)表达的影响。**方法** 将大鼠随机分为健康对照组、糖尿病组和培哚普利干预组。检测各组大鼠的血糖和尿清蛋白,行 Masson 染色观察肾脏形态学变化,应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组织化学检测 SR-A mRNA 及蛋白的表达。**结果** 与健康对照组比较,糖尿病组大鼠血糖和 24 h 尿清蛋白均显著上升;肾组织 SR-A mRNA 和蛋白表达均显著上调,培哚普利干预后,上述指标除血糖外均明显被抑制($P<0.05$)。**结论** 糖尿病大鼠肾小管间质 SR-A 表达增加,培哚普利对糖尿病大鼠肾脏有保护作用,其机制可能部分与下调肾小管间质 SR-A 表达有关。

[关键词] 糖尿病肾病;培哚普利;清道夫受体, A 类**[中图分类号]** R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)18-2461-03

Perindopril down-regulates scavenger receptor A expression in renal tubulointerstitium of diabetic rats

Zeng Yingjuan, Sun Ying, Wen Jianghua, Hu Fang, Luo Shunkui, Lu Hongyun[△]
(Department of Endocrinology, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of an ACE inhibitor, perindopril, on the expression of SR-A in renal tubulointerstitium of diabetic rats. **Methods** Diabetes was induced in male Sprague-Dawley rats by injection with streptozotocin. The rats were then randomly divided into 3 groups: normal control group; untreated diabetes mellitus group and diabetes mellitus group treated with perindopril. After a 24-week treatment, tubulointerstitial injury index was assessed with Masson's trichrome sections. The expression of SR-A mRNA was detected by RT-PCR and the expression of SR-A protein in renal tubulointerstitium was detected by immunohistochemistry. **Results** The tubulointerstitial injury index, the expression of SR-A mRNA were significantly higher in the diabetes group than those in normal control group. Perindopril treatment not only attenuated the tubulointerstitial injury, but also reduced the overexpression of SR-A mRNA in diabetic rats. The expression of SR-A protein was most obvious in renal tubulointerstitium in diabetic rats, which was obviously attenuated by perindopril treatment($P<0.05$). **Conclusion** The findings of the this study indicate that perindopril may have renoprotective effects on diabetic nephropathy via inhibiting the expression of SR-A in renal tubulointerstitium.

[Key words] diabetic nephropathies; perindopril; scavenger receptor, class A

清道夫受体 A(scavenger receptor A, SR-A)是一种跨膜糖蛋白受体,参与氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)和高级糖基化终产物(AGEs)的摄取并且在调节炎症反应、细胞黏附、细胞凋亡等生理病理过程中起着重要作用。最近发现敲除 SR-A 基因的小鼠对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病肾损害具有抵抗性,其 24 h 尿清蛋白、肾小管间质损伤、浸润的巨噬细胞数目及转化生长因子 β (TGF- β)的表达等均较同系野生型糖尿病小鼠明显减少,提示 SR-A 是糖尿病肾病小管间质纤维化的危险因素之一。大量的研究证实血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)能延缓糖尿病肾病小管间质纤维化发展,但是否会对 SR-A 的表达产生一定的作用目前尚不清楚。

1 材料与方 法

1.1 动物与材料 实验动物购自中山大学实验动物中心, STZ 购自美国 Sigma 公司,培哚普利购自法国施维雅公司,大鼠尿清蛋白检测试剂盒购自美国 Bethyl 公司,羊抗鼠 SR-A 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,免疫组织化学 SP(法)试剂盒、DAB 显色试剂盒、Masson 三色染色试剂盒购自福州迈新公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型的建立 用随机数字表将大鼠分为健康对照组($n=9$),糖尿病组($n=9$)和培哚普利干预组($n=9$)。

糖尿病组与培哚普利干预组大鼠给予 STZ(溶于 0.1 mol/L、pH4.2 的枸橼酸缓冲液)60 mg/kg 一次性腹腔注射,72 h 测血糖大于 16.7 mmol/L 为模型制作成功;健康对照组给予等量的枸橼酸缓冲液一次性腹腔注射。培哚普利干预组给予培哚普利 4 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹灌胃,健康对照组和糖尿病组给予等量饮用水。整个实验期间动物喂标准饲料,自由饮水,共观察 24 周。

1.2.2 一般生化指标和标本收集 每 4 周将大鼠放入代谢笼内留取 24 h 尿液,记录尿量,按试剂盒说明书测定尿清蛋白,并检测每只大鼠的随机血糖和体质量;第 24 周测量体质量后处死大鼠,取出肾脏,计算肾脏质量/体质量比值。收集肾脏标本进行相关实验。

1.2.3 Masson 染色 石蜡切片,常规脱蜡至水,Masson 复合染色液染色,磷钼酸溶液染色,苯胺蓝染色,脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。结果判定:每张切片随机选择 10 个视野,观察肾小管间质的病理变化,进行量化评分,0 分:正常;1 分:间质纤维化、炎症细胞浸润、肾小管萎缩、水肿、变性;及小管管型等病变范围小于 25%;2 分:病变范围 25%~<50%;3 分:病变范围 \geq 50%;最后以平均值来表示该标本肾小管间质损伤指数^[1]。

1.2.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 SR-A mRNA 的表达 按照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA, cDNA 的合成参照 cDNA 第一链合成试剂盒说明操作, RT-PCR 反应按照

SYBR Green I PCR 试剂盒说明操作。大鼠特异性基因引物由 Invitrogen 公司合成, SR-A: 正向引物 5'-ACT TCA GCA TGG CAA CCG AC-3', 反向引物 5'-TGG AAA TTG CAT CCA GGG AC-3', 扩增片段长度 105 bp; 内参基因采用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH), 正向引物 5'-AGG GCT GCC TTC TCT TGT GA-3', 反向引物 5'-AAC TTG CCG TGG GTA GAG TCA-3', 扩增片段长度 110 bp。反应体系 50 μ L, 反应条件: 93 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 93 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环, 每个循环延伸后收集一次荧光; 最后进行熔解曲线分析。阴性对照采用灭菌双蒸水代替 cDNA, 采用双标准曲线法相对定量, 以 SR-A 与内参基因表达量的比值来表示其相对表达水平。每个样品复孔 3 次, 取平均值。

1.2.5 免疫组织化学染色 采用 Eli Vision 法。石蜡切片, 常规脱蜡至水, 抗原修复; 3% 过氧化氢灭活内源性酶; 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育一抗(美国 Sata Cruz 公司羊抗鼠 SR-A, 1:200 PBS 稀释); 使用免疫组织化学 SP 试剂盒孵育二抗; DAB 溶液显色, 阳性为棕黄色后终止显色; 苏木素复染后中性树脂封片。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件处理数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组资料比较采用单因素方差分析和 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般指标比较 24 周实验结束时, 糖尿病组大鼠死亡 1

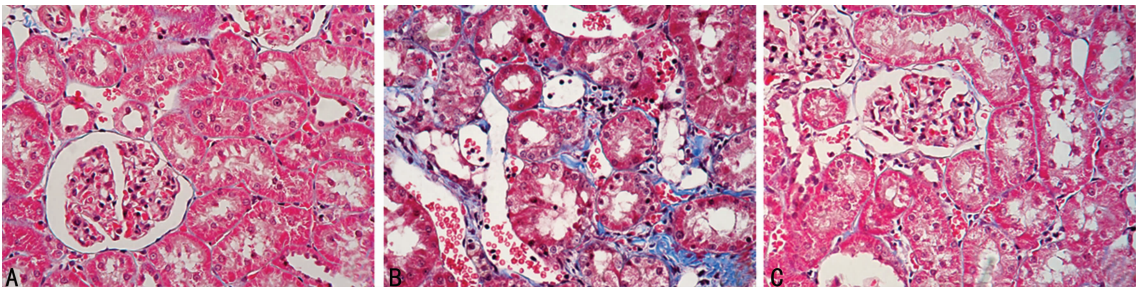
只, 健康对照组与培哌普利干预组无大鼠死亡。糖尿病组大鼠的体质量低于健康对照组 ($P < 0.05$), 而肾脏质量/体质量比值、血糖和 24 h 尿清蛋白均高于健康对照组 ($P < 0.05$); 与糖尿病组比较, 培哌普利干预组大鼠的体质量、肾脏质量/体质量比值、血糖差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 24 h 尿清蛋白明显降低, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠一般指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	体质量 (g)	肾脏质量/体 质量(mg/g)	尿清蛋白 (mg/24 h)	血糖 (mmol/L)
健康对照组	9	624 \pm 71	2.62 \pm 0.26	2.7 \pm 1.3	5.3 \pm 0.6
糖尿病组	8	324 \pm 60 ^a	5.59 \pm 0.74 ^a	26.7 \pm 1.8 ^a	26.7 \pm 3.3 ^a
培哌普利干预组	9	353 \pm 47 ^a	5.46 \pm 0.81 ^a	3.6 \pm 1.4 ^b	26.2 \pm 2.0 ^a

^a: $P < 0.05$, 与健康对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与糖尿病组比较。

2.2 肾脏的形态学改变 Masson 染色可见健康对照组肾脏无明显病理改变, 糖尿病组大鼠肾小管间质有严重组织损伤, 表现为部分肾小管上皮细胞萎缩、空泡样变性, 间质有较多的炎症细胞浸润, 并出现肾间质纤维化, 培哌普利干预组大鼠肾脏的上述病理改变较糖尿病组明显减轻。量化分析结果显示, 糖尿病组 (1.89 \pm 0.23) 的肾小管间质损伤指数显著高于健康对照组 (0.25 \pm 0.11) 和培哌普利干预组 (0.71 \pm 0.12), 均 $P < 0.05$ 。见图 1。



A: 健康对照组; B: 糖尿病组; C: 培哌普利干预组。

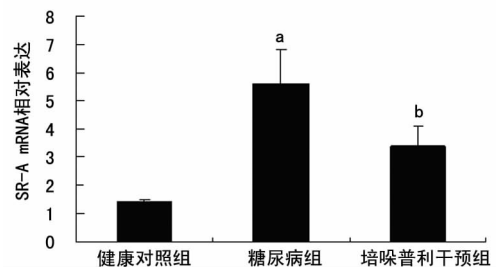
图 1 各组大鼠肾小管间质 Masson 染色 ($\times 200$)

2.3 培哌普利干预对肾小管间质 SR-A mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示糖尿病组大鼠肾脏 SR-A mRNA 表达水平约为健康对照组的 4 倍 (5.6 \pm 1.2 vs. 1.4 \pm 0.1, $P < 0.05$); 培哌普利干预组肾脏 SR-A mRNA 表达显著低于糖尿病组 (3.4 \pm 0.7 vs. 5.6 \pm 1.2, $P < 0.05$)。见图 2。

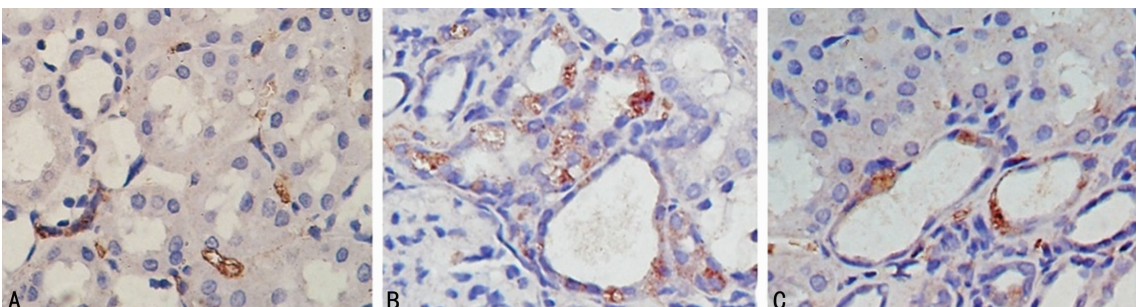
2.4 培哌普利干预组对肾小管间质 SR-A 蛋白表达的影响

免疫组织化学染色可见健康对照组大鼠肾小管上皮细胞和肾间质只有少量棕褐色的阳性着色; 糖尿病组肾小管间质中阳性着色明显增多; 与糖尿病组比较, 培哌普利干预组的着色范围明显减少。见图 3。



^a: $P < 0.05$, 与健康对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与糖尿病组比较。

图 2 各组大鼠肾脏 SR-A mRNA 的相对表达



A: 健康对照组; B: 糖尿病组; C: 培哌普利干预组。

图 3 各组大鼠肾小管间质 SR-A 蛋白表达 (免疫组织化学 $\times 200$)

3 讨 论

糖尿病肾病是糖尿病最常见的微血管并发症之一,是终末期肾衰竭的最常见病因。研究显示,肾小管间质纤维化几乎是所有肾脏疾病发展到终末期肾病的共同通路,肾功能减退与小管间质的病变程度的联系比肾小球更密切,糖尿病肾病患者的远期预后主要取决于小管间质病变程度^[2]。因此研究糖尿病肾病肾小管间质病变的机制,对改善其预后具有重要意义。

SR-A 是一种细胞表面的跨膜糖蛋白受体,最初从巨噬细胞上发现。在早期的动脉粥样硬化的研究中证实,SR-A 主要介导血液中化学修饰的脂质如 ox-LDL 进入细胞内而不受控制最终造成泡沫细胞形成^[3]。有研究发现肾小管上皮细胞也存在包括 SR-A 在内的多种清道夫受体,而且可能与肾小管间质的损伤相关^[4]。

许多与糖尿病肾病发病密切相关的因素如肾素-血管紧张素系统活性增加、非酶糖基化作用、氧化应激等均可以上调 SR-A 表达。糖尿病肾病早期肾内肾素-血管紧张素系统(RAS)即被激活,局部血管紧张素 II (Ang II) 产生增加,Ang II 可呈时间和剂量依赖性上调 SR-A,这一作用是通过 PKC 信号传导途径实现的^[5]。另外,长期高血糖状态加速蛋白质发生非酶促糖基化反应,肾组织内糖基化终产物(AGEs)蓄积增多,AGEs 通过活化酪氨酸蛋白激酶后进一步激活磷脂酶 C,最终激活 NF- κ B,而促进 SR-A 的表达^[6]。此外,糖尿病(尤其是糖尿病肾病)患者常伴有脂质代谢紊乱,血清中低密度脂蛋白(LDL)水平升高。在糖尿病状态下,体内氧化应激增强,LDL 容易被氧化修饰为 ox-LDL,ox-LDL 与 SR-A 的结合能够刺激巨噬细胞分泌前炎性因子和生长因子,这些因子反过来又刺激 SR-A 的表达^[3,7]。本研究中糖尿病大鼠肾小管间质 SR-A 基因和蛋白质表达升高可能是上述因素共同作用的结果。

RAS 激活在糖尿病肾病肾小管间质损害中起着重要作用,但具体机制尚不完全清楚。大量的基础实验及临床研究已证实使用 ACEI 阻断血管紧张素系统(RAS)对糖尿病肾病具有保护作用^[1,8-12]。ACEI 抑制 Ang II 生成,一方面能改善糖尿病肾脏血流动力学异常;另一方面也有降低微炎性反应,下调小管间质 TGF- β 表达,抗肾小管间质纤维化的作用^[13]。本研究首次观察了 ACEI 类药物培哌普利干预对 STZ 诱导的糖尿病大鼠肾脏 SR-A 表达的影响,发现培哌普利干预 24 周后,不仅降低 24 h 尿清蛋白,减轻肾小管间质的病理学改变及巨噬细胞的浸润,而且显著下调 SR-A 表达。但其抑制 SR-A 表达的机制尚不清楚,除了减少尿蛋白带来的肾脏保护效应之外,不排除通过其他途径发挥作用。糖尿病肾病早期肾内 RAS 即被激活,小管间质局部 Ang II 产生增加^[14],而既往研究已在细胞水平上证实,Ang II 可呈时间和剂量依赖性上调 SR-A^[5],因此,培哌普利下调 SR-A 表达的作用,可能与其阻断糖尿病肾组织局部的 RAS 活性,抑制 Ang II 生成过多有关,但其确切机制有待进一步研究。

总之,本研究观察到糖尿病大鼠肾小管间质 SR-A 表达增加,ACEI 类药物培哌普利可减少 SR-A 的表达,改善糖尿病大鼠肾小管间质损伤。

参考文献

[1] Radford MG Jr, Donadio JV Jr, Bergstralh EJ, et al. Predicting renal outcome in IgA nephropathy[J]. *J Am Soc*

Nephrol, 1997, 8(2): 199-207.

- [2] Gilbert RE, Cooper ME. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury[J]. *Kidney Int*, 1999, 56(5): 1627-1637.
- [3] de Winther MP, van Dijk KW, Havekes LM, et al. Macrophage scavenger receptor class A: a multifunctional receptor in atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(2): 290-297.
- [4] Okamura DM, Lopez-Guisa JM, Koelsch K, et al. Atherogenic scavenger receptor modulation in the tubulointerstitium in response to chronic renal injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293(2): F575-585.
- [5] Ruan XZ, Varghese Z, Powis SH, et al. Human mesangial cells express inducible macrophage scavenger receptor[J]. *Kidney Int*, 1999, 56(2): 440-451.
- [6] 贾庆哲, 梁春, 黄东, 等. 糖基化终产物对单核细胞源树突状细胞清道夫受体 A 表达的影响及其机制的研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, (10): 27-31.
- [7] Wilcox JN, Nelken NA, Coughlin SR, et al. Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques[J]. *J Atheroscler Thromb*, 1994, 1 Suppl 1: S10-13.
- [8] Allard J, Buleon M, Cellier E, et al. ACE inhibitor reduces growth factor receptor expression and signaling but also albuminuria through B2-kinin glomerular receptor activation in diabetic rats[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293(4): F1083-1092.
- [9] Zheng F, Zeng YJ, Plati AR, et al. Combined AGE inhibition and ACEi decreases the progression of established diabetic nephropathy in B6 db/db mice[J]. *Kidney Int*, 2006, 70(3): 507-514.
- [10] Stojiljkovic L, Behnia R. Role of renin angiotensin system inhibitors in cardiovascular and renal protection: a lesson from clinical trials[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(13): 1335-1345.
- [11] Amann B, Tinzmann R, Angelkort B. ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(8): 2421-2425.
- [12] Vejakama P, Thakkinian A, Lertrattananon D, et al. Renin-protective effects of renin-angiotensin system blockade in type 2 diabetic patients: a systematic review and network meta-analysis[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(3): 566-578.
- [13] Wiggins KJ, Tiauw V, Zhang Y, et al. Perindopril attenuates tubular hypoxia and inflammation in an experimental model of diabetic nephropathy in transgenic Ren-2 rats[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2008, 13(8): 721-729.
- [14] Burns KD. Angiotensin II and its receptors in the diabetic kidney[J]. *Am J Kidney Dis*, 2000, 36(3): 449-467.

(收稿日期: 2014-12-08 修回日期: 2015-02-10)